



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0109469
(43) 공개일자 2021년09월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 39/215 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0025980
(22) 출원일자 2021년02월25일
심사청구일자 2021년02월25일
(30) 우선권주장
1020200024557 2020년02월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박정은
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 206동 901호(전민동, 엑스포아파트)
(74) 대리인
리앤목특허법인

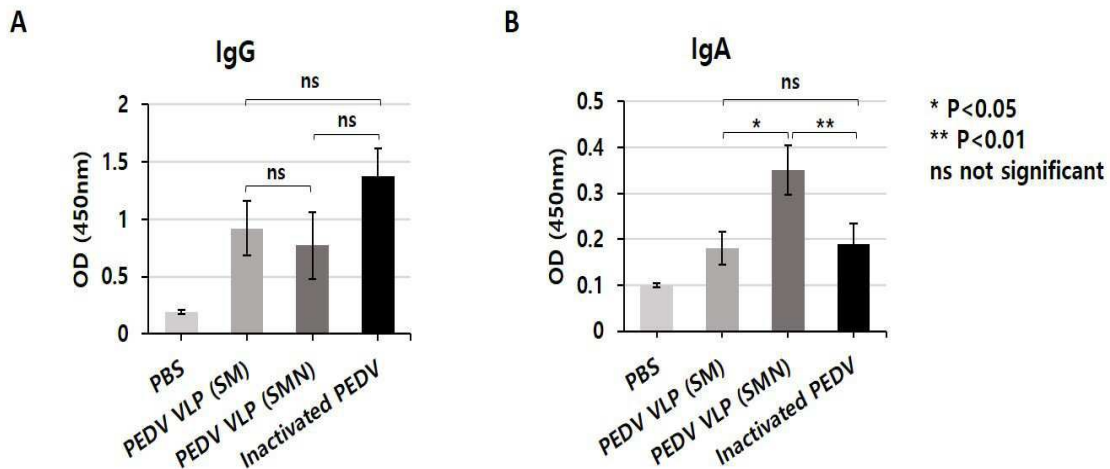
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 바이러스 유사 입자를 이용한 돼지 유행성 설사병 바이러스 백신 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 출원은 바이러스 유사 입자를 이용한 돼지 유행성 설사병 바이러스 백신 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 일 실시예에 따르면, 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질, 멤브레인 단백질, 및 뉴클레오펜 단백질 을 포함하는 바이러스 유사 입자, 상기 바이러스 유사 입자를 포함하는 돼지 유행성 설사병 바이러스 예방용 백신 조성물, 및 상기 바이러스 유사 입자를 제조하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61P 31/14 (2018.01)

A61K 2039/5258 (2013.01)

C12N 2770/20023 (2013.01)

C12N 2770/20034 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1D1A3B03033883

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명

연구사업명 이공분야기초연구

연구과제명 슈도바이러스 및 유사바이러스입자를 이용한 돼지유행성설사병 백신 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명

연구기간 2017.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

돼지 유행성 설사병 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus: PEDV)의 스파이크(spike) 단백질, 멤브레인(membrane) 단백질, 및 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질을 포함하는 바이러스 유사 입자로서,

상기 멤브레인 단백질은 구형의 외피를 형성하고, 상기 스파이크 단백질은 상기 구형의 외피로부터 외향으로 돌출되어 있으며, 상기 뉴클레오캡시드 단백질은 상기 구형의 외피 내부에 위치하며,

상기 바이러스 유사 입자는 숙주 세포에서 자가 조립(self-assembly)되어 형성되는 것인, 바이러스 유사 입자.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 스파이크 단백질은 서열번호 1의 염기서열에 의해 코딩되는 것인, 바이러스 유사 입자.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 멤브레인 단백질은 서열번호 2의 염기서열에 의해 코딩되는 것인, 바이러스 유사 입자.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 뉴클레오캡시드 단백질은 서열번호 4의 염기서열에 의해 코딩되는 것인, 바이러스 유사 입자.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 바이러스 유사 입자는 엔벨로프(envelope) 단백질을 추가로 포함하며,

상기 멤브레인 단백질과 접합되어 구형의 외피를 형성하는 것인, 바이러스 유사 입자.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 엔벨로프 단백질은 서열번호 3의 염기서열에 의해 코딩되는 것인, 바이러스 유사 입자.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항의 바이러스 유사 입자를 유효성분으로 포함하는 돼지 유행성 설사병 바이러스 예방용 백신 조성물.

청구항 8

- (a) 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크(spike) 단백질을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터(pCAGGS-S) 클론, 돼지 유행성 설사병 바이러스의 멤브레인(membrane) 단백질을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터(pCAGGS-M) 클론, 및 돼지 유행성 설사병 바이러스의 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터(pCAGGS-N) 클론을 숙주 세포에 형질감염시키는 단계;
- (b) 상기 형질감염된 숙주 세포를 배양하고, 이로부터 배양물을 수득하는 단계; 및
- (c) 상기 배양물로부터 바이러스 유사 입자를 수득하는 단계를 포함하는, 바이러스 유사 입자를 제조하는 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 단계 (a)에서, 상기 스파이크 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 1의 염기서열이고;

상기 멤브레인 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 2의 염기서열이며; 및

상기 뉴클레오캡시드 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 4의 염기서열인 것인, 바이러스 유사 입자를 제조하는 방법.

청구항 10

청구항 8에 있어서, 상기 단계 (a)에서, 돼지 유행성 설사병 바이러스의 엔벨로프(envelope) 단백질을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터(pCAGGS-E) 클론을 숙주 세포에 형질감염시키는 것을 추가로 포함하는 것인, 바이러스 유사 입자를 제조하는 방법.

청구항 11

청구항 8에 있어서, 상기 단계 (a)에서, 재조합 발현 벡터 pCAGGS-S 클론, pCAGGS-M 클론, 및 pCAGGS-N 클론의 중량비는 1: 0.5 내지 1.5: 0.5 내지 1.5인 것인, 바이러스 유사 입자를 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 바이러스 유사 입자를 이용한 돼지 유행성 설사병 바이러스 백신 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 돼지 유행성 설사병(porcine epidemic diarrhea: PED)은 원인체인 돼지 유행성 설사병 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus: PEDV)의 감염에 의하여 연령에 관계없이 발생하는 돼지의 전염병으로, 구토와 수양성 설사가 주요한 증상이다. 또한, 이 질병은 1992년 처음으로 국내에서 발생된 후 전국적으로 확산된 바 있으며, 포유자돈의 설사병 중 가장 큰 피해를 야기하는 질병으로서, 양돈 농가에 많은 경제적 피해를 주고 있다. 돼지 유행성 설사병을 일으키는 돼지 유행성 설사병 바이러스는 주로 소장 용모세포에 증식하여 용모 상피세포를 변성 또는 괴사시켜 용모의 위축과 탈락을 동반하고, 흡수장애를 초래하여 지속적인 수양성 설사를 일으킨다. 돼지의 연령에 상관없이 장염을 일으키며 심한 설사와 탈수현상을 동반하고 심지어 자돈에서의 치사율은 80~90%에 이른다.

[0003] 이와 같은 돼지유행성 설사병 바이러스 감염으로 인한 피해를 막을 수 있는 가장 확실한 방법은 축산 관계자 및 축산 관련 차량의 철저한 소독과 차단이고, 두 번째는 적절한 백신 접종을 통한 예방에 있다. 이에, 우리나라에서는 돼지유행성 설사병을 법정 제3종 전염병으로 지정하여 관리하고 있으며, 현재 생백신과 불활화 백신 및 경구 백신이 상용화되어 농가에 보급하고 있다. 그러나, 해당 백신들은 주로 2000년대 초반에 만들어진 것이며, 코로나바이러스 속에 속하는 돼지유행성 설사병 바이러스는 RNA 바이러스로서, 그 변이율이 매우 높기 때문에 기존 백신의 효능은 미약할 가능성이 존재한다고 알려져 있다. 또한, 기존의 혈관에 주입시키는 주사 백신체제

는 백신이 혈관 내 에서만 순환하고, 장내에는 영향을 미치지 못하기 때문에 장내 서식하여 돼지 유행성 설사병을 유발하는 돼지유행성 설사병 바이러스의 면역에는 효과가 없으며, 경구로 섭취하는 방식의 경구 백신 체제만이 돼지유행성 설사병 바이러스의 면역에는 효과가 있는 것으로 알려졌다. 따라서, 여전히 면역성이 우수하면서 안전하고 안정적인 돼지 유행성 설사병 백신에 대한 연구 및 개발이 필요한 실정이다.

[0004] 이러한 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 종래의 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 돼지유행성 설사병 바이러스의 구조를 모사한 바이러스 유사 입자는 live virus와 달리 감염을 일으키는 유전물질을 포함하고 있지 않으므로 우수한 안전성을 나타냄과 동시에, 유의적인 면역 유도 반응을 나타낼 수 있음을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질, 멤브레인 단백질, 및 뉴클레오캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 유사 입자를 제공하는 것이다.

[0006] 다른 양상은 상기 바이러스 유사 입자를 유효성분으로 포함하는 돼지 유행성 설사병 바이러스 예방용 백신 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 다른 양상은 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터 클론, 돼지 유행성 설사병 바이러스의 멤브레인 단백질을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터 클론, 및 돼지 유행성 설사병 바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터 클론을 숙주 세포에 형질감염시키는 단계를 포함하는 바이러스 유사 입자를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 출원의 다른 목적 및 이점은 첨부한 청구범위 및 도면과 함께 하기의 상세한 설명에 의해 보다 명확해질 것이다. 본 명세서에 기재되지 않은 내용은 본 출원의 기술 분야 또는 유사한 기술 분야 내 숙련된 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 것이므로 그 설명을 생략한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0012] 일 양상은 돼지 유행성 설사병 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus: PEDV)의 스파이크(spike) 단백질, 멤브레인(membrane) 단백질, 및 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질을 포함하며,

[0013] 상기 멤브레인 단백질은 구형의 외피를 형성하고, 상기 스파이크 단백질은 상기 구형의 외피로부터 외향으로 돌출되어 있으며, 상기 뉴클레오캡시드 단백질은 상기 구형의 외피 내부에 위치하는 것인, 바이러스 유사 입자를 제공한다.

[0014] 본 명세서에서 사용된 용어, “바이러스 유사 입자 (Virus-Like Particle: VLP)”는 바이러스성 단백질을 수반하거나 수반하지 않는 비감염성 바이러스성 소단위체를 의미하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 바이러스 유사 입자는 바이러스와 유사한 형태를 띠고 있는 재조합 단백질을 의미하는 것일 수 있으며, 상기 바이러스 유사 입자는 바이러스의 구조 단백질들간 결합을 통하여 실제 바이러스와 유사한 형태로 자가 조립(self-assembly)이 되지만, 조립 과정에서 바이러스의 유전자는 바이러스 유사 입자 내부로 포함되지 않는 것일 수 있다. 상기의 특성을 갖는 바이러스 유사 입자는 실제 바이러스와 매우 유사한 형태를 띠고 있어 체내 주입 시 높은 면역원성을 나타낼 수 있고, 바이러스의 유전자를 포함하고 있지 않으므로 체내에서 증식이 불가능한 안전한 항원으로 작용할 수 있다.

[0015] 본 명세서에서 사용된 용어, “돼지 유행성 설사병 바이러스(PEDV)”는 돼지에서 유행성 설사병을 유발하는 원인 바이러스로서, 알파코로나바이러스(Alphacoronavirus) 속에 속하며, 단일 가닥의 양방향성 RNA(single-

stranded positive-sense RNA)를 유전체로 가진다. 돼지 유행성 설사병 바이러스의 유전체는 4 개의 구조 단백질을 암호화하는 총 7 개의 전자 해석틀(open reading frame, ORF)로 구성된다.

- [0016] 상기 바이러스 유사 입자는 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질, 멤브레인 단백질, 및 뉴클레오캡시드 단백질을 포함할 수 있다. 여기서, 스파이크 단백질은 바이러스 표면에 존재하며, 곤봉 모양의 돌기 형태로 이루어진 구조 단백질이다. 상기 단백질은 숙주세포의 당 단백질 수용체와 결합하는 것으로 알려져 있으며, 이는 세포막과 바이러스 외막의 융합, 그리고, 중화 항체의 생성을 야기할 수 있다. 또한, 뉴클레오캡시드 단백질은 외피의 내부에 존재하며, 세포성 면역 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다.
- [0017] 구체적으로, 상기 바이러스 유사 입자는 자연적으로 self-assembly가 되는 특성을 가진 바이러스 구조 단백질로 만들어져서 병원체의 형태를 모방하게 된다. 상기 바이러스 유사 입자는 원래 병원체와 유사하거나 동일한 구조로 제조되고 고도의 반복성을 가진 형태의 항원성을 나타내는 에피토프를 제시한다. 이에 따라 B cell 면역글로불린 수용체가 crosslinking 되도록 하고 결국 B cell 활성화를 유도하게 된다. 외부에서 제공되는 항원(exogenous antigen)으로서 바이러스 유사 입자는 전문적인 항원 제시 세포들 특히 수지상세포(dendritic cell, DC) 등에 의해 효율적으로 세포내로 들어가게 되고 항원 processing을 거쳐서 MHC class II 분자에 의해 제시되고, co-stimulatory 분자와 사이토카인 생산의 증가에 의해 DC 활성화, 성숙화, CD4+ T helper cell의 자극에 의해 강력한 체액성과 세포성 면역을 유도하게 된다. 나아가 자연 상태의 바이러스와 유사하게 바이러스 유사 입자는 DC의 세포질 내에서 process되고 MHC class I 분자에 의해 세포표면에 제시된다. 그리고 cross-presentation mechanism에 의해 세포 살해성 CD8+T세포에 제시되어 강력한 세포 살해성 면역반응을 유도하게 된다.
- [0018] 일 구체예에서, 상기 스파이크 단백질은 서열번호 1의 염기서열에 의해 코딩되는 것일 수 있고, 상기 멤브레인 단백질은 서열번호 2의 염기서열에 의해 코딩되는 것일 수 있고, 상기 뉴클레오캡시드 단백질은 서열번호 4의 염기서열에 의해 코딩되는 것일 수 있으며, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위에 포함된다. 구체적으로, 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 염기서열은 동일한 기능성을 발휘한다는 전제 하에서, 서열번호 1, 2, 및 4의 염기서열과 각각 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 상기 염기서열에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인될 수 있다.
- [0019] 상기 바이러스 유사 입자는 돼지 유행성 바이러스의 구조를 모사한 것으로서, 예를 들어, 상기 멤브레인 단백질은 구형의 외피를 형성하고, 상기 스파이크 단백질은 상기 구형의 외피로부터 외향으로 돌출되어 있으며, 상기 뉴클레오캡시드 단백질은 상기 구형의 외피 내부에 위치하는 것일 수 있다. 또한 상기 바이러스 유사 입자는 숙주세포 내에서 자가 조립되어 형성되는 것일 수 있다.
- [0020] 또한, 상기 바이러스 유사입자는 엔벨로프(envelope) 단백질을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 엔벨로프 단백질은 멤브레인 단백질과 접합되어 구형의 외피를 형성하는 것일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 엔벨로프 단백질은 서열번호 3의 염기서열에 의해 코딩되는 것일 수 있고, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위에 포함된다. 구체적으로, 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 염기서열은 동일한 기능성을 발휘한다는 전제 하에서, 서열번호 3의 염기서열과 각각 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 상기 염기서열에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인될 수 있다.
- [0022] 일 실시예에 따르면, 상기 구조 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 각각의 벡터를 사용하여, 이들을 숙주 세포에 형질감염시킨 경우, 상기 스파이크 단백질, 멤브레인 단백질, 엔벨로프 단백질, 및 뉴클레오캡시드 단백질은 숙주세포 내에서 모두 발현되고, 이들은 자가 조립되어 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자를 형성함을 확인하였다. 또한, 일 실시예에 따르면, 상기 바이러스 유사 입자는 개체의 면역원성과 밀접한 관련성을 나타내는 스파이크 단백질과 뉴클레오캡시드 단백질을 유의적인 수준으로 포함하였고, 상기 바이러스 유사 입자를 실험동물에 접종한 경우, 높은 항체와 중화능을 나타냄을 확인하였다.
- [0023] 아울러, 일 실시예에 따르면, 멤브레인 단백질의 발현은 다른 구조 단백질의 발현과는 독립적인 경향을 보여 주었고, 재조합 세포 내 스파이크 단백질의 발현에 큰 영향을 미침을 알 수 있었다. 또한, 엔벨로프 단백질의 발현은 스파이크 단백질의 발현량을 감소시킨 반면, 뉴클레오캡시드 단백질의 발현은 스파이크 단백질의 수준을 증가시킴을 확인하였다. 즉, 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자 내 구조 단백질의 특정 조합, 구체적으로,

스파이크, 멤브레인, 및 뉴클레오캡시드 단백질의 조합을 통해, 유사 입자 내 구조 단백질의 발현 양상을 조절할 수 있고, 이를 통하여, 바이러스 유사 입자의 면역원성을 강화시킬 수 있음을 확인하였다.

[0024]

[0025]

다른 양상은 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터, 돼지 유행성 설사병 바이러스의 멤브레인 단백질을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터, 및 돼지 유행성 설사병 바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[0026]

상기 재조합 발현 벡터는 돼지 유행성 설사병 바이러스의 엔벨로프 단백질을 코딩하는 염기 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0027]

다른 양상은 상기 재조합 발현 벡터를 포함하는 형질 전환체를 제공한다.

[0028]

상기 재조합 발현 벡터 및 형질 전환체에 대한 설명에서 언급된 용어 또는 요소 중 이미 언급된 것과 동일한 것은 상술한 바와 같다.

[0029]

본 명세서에서 사용되는 용어, "벡터"는 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 지칭한다. 일 실시예에 따른 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 및/또는 인핸서와 같은 발현 조절 요소를 포함할 수 있으며, 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 상기 벡터는, 숙주 세포 내에서 안정적으로 상기 융합 단백질을 발현시킬 수 있는, 발현용 벡터일 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다. 예를 들어, 상기 벡터는 벡터를 함유 하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 벡터인 경우, 복제 기원을 포함할 수 있다. 또한, 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 도입될 수 있으며, 상기 벡터는 플라스미드, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 레트로바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 및 배시니아 바이러스로 구성되는 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0030]

본 명세서에서 사용되는 용어 "형질전환"은 외부로부터 주어진 DNA에 의하여 생물의 유전적인 성질이 변하는 것으로, 즉 생물의 어떤 계통의 세포에서 추출된 핵산의 일종인 DNA를 다른 계통의 살아있는 세포의 주었을 때 DNA가 그 세포에 들어가서 유전형질이 변화하는 현상으로 형질변환, 형질전환 또는 형변환 등이라고도 지칭한다.

[0031]

본 명세서에서 사용되는 용어 "형질전환체"는 형질전환으로 인해 생성된 형질전환식물 또는 형질전환동물을 의미하며, 유전자 재조합 기술을 이용하여 특정 유전자의 변형 또는 변이가 유발되어 생성된 유전자재조합체를 포함한다. 상기 형질전환체는 예를 들어, 재조합 발현 벡터가 도입된 세포일 수 있으며, 상기 세포, 예를 들어, 진핵 세포는 효모, 곰팡이, 원생동물 (protozoa), 식물, 고등 식물 및 곤충, 또는 양서류의 세포, 또는 CHO, HeLa, HEK293, 및 COS-1과 같은 포유 동물의 세포일 수 있고, 예를 들어, 당업계에서 일반적으로 사용되는, 배양된 세포 (인 비트로), 이식된 세포 (graft cell) 및 일차 세포 배양 (인 비트로 및 엑스 비보(ex vivo)), 및 인 비보 (in vivo) 세포, 및 또한 인간을 포함하는 포유동물의 세포 (mammalian cell)일 수 있다. 또한, 상기 유기체는 효모, 곰팡이, 원생동물, 식물, 고등 식물 및 곤충, 양서류, 또는 포유 동물일 수 있다. 또한, 상기 세포는 동물 세포 또는 식물세포일 수 있다.

[0032]

일 구체예에서, 상기 재조합 발현 벡터는 서열번호 1의 염기서열에 의해 코딩되는 스파이크 단백질, 서열번호 2의 염기서열에 의해 코딩되는 멤브레인 단백질, 서열번호 3의 염기서열에 의해 코딩되는 엔벨로프 단백질, 및 서열번호 4의 염기서열에 의해 코딩되는 뉴클레오캡시드 단백질로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질을 발현시키기 위한 것일 수 있다. 또한, 상기 형질전환체는 상기 스파이크 단백질, 멤브레인 단백질, 및 뉴클레오캡시드 단백질이 모두 발현되는 세포로서, 상기 세포 내에서 자가 조립되어 돼지 유행성 설사병 바이러스의 구조를 모사한 바이러스 유사 입자를 형성하는 것일 수 있다.

[0034]

다른 양상은 상기 바이러스 유사 입자를 유효성분으로 포함하는 돼지 유행성 설사병 바이러스 예방용 백신 조성물을 제공한다.

[0035]

상기 돼지 유행성 설사병 바이러스 예방용 백신 조성물에 대한 설명에서 언급된 용어 또는 요소 중 이미 언급된

것과 동일한 것은 상술한 바와 같다.

- [0036] 상기 백신 조성물은 상기 바이러스 유사 입자 또는 이의 농축액을 포함하는 형태이거나, 형질전환 숙주 세포 자체 또는 형질전환 세포의 건조 분말 형태로 사용할 수 있다. 또한, 상기 백신 조성물은 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있으며 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0037] 상기 백신 조성물은 안정제, 유화제, 수산화알루미늄, 인산알루미늄, pH 조정제, 계면활성제, 리포솜, 이스콤(iscom) 보조제, 합성 글리코펩티드, 증량제, 카복시폴리메틸렌, 세균 세포벽, 세균 세포벽의 유도체, 세균백신, 동물 폭스바이러스 단백질, 바이러스 일부(subviral) 입자 보조제, 콜레라 독소, N, N'-디옥타데실-N', N'-비스(2-하이드록시에틸)-프로판디아민, 모노포스포릴 지질 A, 디메틸디옥타데실-암모늄 브로마이드 및 이의 혼합물로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 제2 보조제를 더 포함할 수도 있다.
- [0038] 상기 백신 조성물은 의학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 “의학적으로 허용 가능한 담체”는 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항원 보강제, 안정제, 희석제, 보존제, 항균제 및 항진균제, 등장성 작용제, 흡착 지연제 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 상기 백신 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제, 희석제는 락토즈, 텍스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 글리세린, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘실리케이 트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드 록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 또한, 상기 백신 조성물은 경구, 근육, 피하, 복강, 정맥, 진피, 복강 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 의 투여경로를 통해 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 또한, 상기 백신 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 제제화할 경우에는 통상적으로 사용 되는 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제가 함께 사용될 수 있다.
- [0042] 경구투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 레시틴 유사 유화제에 적어도 하나 이상의 부형제 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등이 함께 사용될 수 있다. 또한 상기 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제 가 사용될 수도 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 사용될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제가 사용될 수 있다. 비수용성제제, 현탁제는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리 브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0044] 다른 양상은 (a) 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크(spike) 단백질을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 재 조합 발현 벡터(pCAGGS-S) 클론, 돼지 유행성 설사병 바이러스의 멤브레인(membrane) 단백질을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터(pCAGGS-M) 클론, 및 돼지 유행성 설사병 바이러스의 뉴클레오캡시드 (nucleocapsid) 단백질을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터(pCAGGS-N) 클론을 숙주 세포에 형질 감염시키는 단계;
- [0045] (b) 상기 형질감염된 숙주 세포를 배양하고, 이로부터 배양물을 수득하는 단계; 및
- [0046] (c) 상기 배양물로부터 바이러스 유사 입자를 수득하는 단계를 포함하는, 바이러스 유사 입자를 제조하는 방법 을 제공한다.
- [0047] 상기 바이러스 유사 입자를 제조하는 방법에 대한 설명에서 언급된 용어 또는 요소 중 이미 언급된 것과 동일한 것은 상술한 바와 같다.
- [0048] 본 명세서에서 사용되는 용어 "형질감염"은 벡터를 숙주 세포 내로 혼입시킬 수 있는 모든 기전을 지칭한다. 성 공적인 형질감염으로 인해, 숙주 세포가 해당 벡터에 의해 수반된 모든 작동성 유전자를 발현시킬 수 있는 능력 이 생긴다. 형질감염은 안정적이거나 일시적일 수 있다. 일시적 형질감염의 한 가지 예는 벡터가 숙주 세포 게놈 내에 통합되지 않는, 특정 세포 내에서의 벡터 발현을 포함한다. 또 다른 한편, 안정적 형질감염은 벡터가 숙주 세포 게놈 내에 통합되는, 특정 세포 내에서의 벡터 발현을 포함한다.

- [0049] 형질감염을 일으키는 방법 및 조건은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 인산칼슘 공침(Graham, F. L. et al., J. Virology 52:456-467, 1973), 프로타민(Wienhues, U. et al., DNA(NY) 6:81-89, 1987), 리포펙틴 및 일렉트로포레이션(Mann, S. G. and King, L. A., J. Gen. Virology 70:3501-3505, 1989)이 있다.
- [0050] 일 구체예에서, 상기 단계 (a)에서, 돼지 유행성 설사병 바이러스의 엔벨로프(envelope) 단백질을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터(pCAGGS-E) 클론을 숙주 세포에 형질감염시키는 것을 추가로 포함할 수 있다.
- [0051] 일 구체예에서, 상기 단계 (a)의 재조합 발현 벡터 pCAGGS-S 클론, pCAGGS-M 클론, pCAGGS-N 클론의 중량비는 1: 0.5 내지 1.5: 0.5 내지 1.5일 수 있거나, 상기 단계 (a)의 재조합 발현 벡터 pCAGGS-S 클론, pCAGGS-E 클론, pCAGGS-M 클론, pCAGGS-N 클론의 중량비는 1: 0.5 내지 1.5: 0.5 내지 1.5: 0.5 내지 1.5일 수 있으며, 예를 들어, 1:1:1, 또는 1:1:1:1일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 일 구체예에서, 상기 단계 (b)의 형질감염된 숙주 세포를 72 내지 120 시간 동안 배양하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 상기 형질감염된 숙주 세포를 72 내지 80 시간, 72 내지 96 시간, 72 내지 108 시간, 80 내지 96 시간, 80내지 108 시간, 80 내지 120 시간, 96 내지 108 시간, 96 내지 120 시간 동안 배양하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 일 구체예에서, 상기 단계 (c)의 바이러스 유사 입자를 수득하는 단계는 상기 배양물의 원심분리하여 수득된 상층액으로부터 바이러스 유사 입자를 분리하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 단계는 500 내지 1,500 xg 조건에서 5 내지 15분 동안 1차 원심분리를 수행하는 단계; 및 50,000 내지 150,000 xg 조건에서 30분 내지 1시간 30분 동안 수크로오스 쿠션을 사용하여 2차 원심분리를 수행하는 단계를 포함할 수 있다. 이때, 온도 조건은 2 내지 15℃일 수 있으며, 이는 필요에 따라 적의 변경될 수 있다.

발명의 효과

- [0054] 일 양상에 따른 바이러스 유사 입자는 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질, 엠브레인 단백질, 및 뉴클레오캡시드 단백질을 포함하며, 상기 단백질들은 숙주 세포에서 자가 조립되어 본래의 바이러스와 형태학적 및 항원적 구조가 같은 형태와 성질을 나타내게 되고, 이에 따라, 유의적인 면역원성을 나타낸다. 또한, 일 양상에 따른 바이러스 유사 입자는 감염을 일으키는 유전물질을 포함하고 있지 않으므로, 병원성을 가지지 않아 안전성이 우수하다.
- [0055] 따라서, 일 양상에 따른 바이러스 유사 입자는 돼지 유행성 설사병 바이러스 예방용 백신 조성물의 유효성분으로 활용될 수 있고, 이를 이용한 치료제 또는 항바이러스 개발, 진단법 및 효율성 평가 등에 확대 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0056] 도 1은 돼지 유행성 설사병 바이러스와 일 실시예에 따른 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자의 구조한 비교한 도이다.
- 도 2는 일 실시예에 따라 제조된 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자 내 스파이크 단백질 및 뉴클레오캡시드 단백질을 웨스턴 블랏팅을 통하여 확인한 결과이다.
- 도 3은 일 실시예에 따른 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자의 접종에 의한 실험동물의 항체가 수준을 확인한 결과이다.
- 도 4는 일 실시예에 따른 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자의 접종에 의한 실험동물의 중화능을 확인한 결과이다.
- 도 5는 일 실시예에 따라 각각의 구조 단백질 유전자로 형질감염된 HEK293T 세포를 대상으로, 세포 용해물 및 상층액 내 구조 단백질의 수준을 웨스턴 블랏팅을 통하여 확인한 결과이다.
- 도 6은 일 실시예에 따라 S 단백질 또는 특정 구조 단백질 조합의 유전자로 형질감염된 HEK293T 세포를 대상으로, 세포 용해물 및 상층액 내 구조 단백질의 수준을 웨스턴 블랏팅을 통하여 확인한 결과이다.
- 도 7은 특정 구조 단백질 조합의 유전자로 형질감염된 HEK293T 세포를 대상으로, S 단백질과 M 단백질 간 발현 비율을 정량적으로 나타낸 결과이다.

도 8은 일 실시예에 따른 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자의 접종에 의한 실험동물 혈청 내 (A) IgG 및 (B) IgA 역가를 확인한 결과이다.

도 9는 일 실시예에 따른 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자의 접종에 의한 실험동물의 항체가 수준을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0059] 실시예 1: 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자를 제조하기 위한 재조합 발현 벡터의 제조

[0060] 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자의 제조를 위하여 돼지 유행성 설사병 바이러스의 구조 단백질인 스파이크, 멤브레인, 엔벨로프, 뉴클레오캡시드 단백질 유전자를 GenScript에서 합성하였다. 합성에 사용한 유전정보는 AF353511로부터 얻었으며, 진핵세포 내에서의 발현율을 높이기 위해 Kozak sequence를 추가하고 codon-optimization을 수행하였다. 상기 방법에 따라 합성한 유전자의 염기서열은 각각 서열번호 1 내지 4와 같다.

[0061] 이후, 상기 실시예 1에서 합성된 유전자 각각을 백본(backbone) 벡터인 pCAGGS.MCS vector(Addgene)에 EcoRI (GAATTC)와 XhoI (CTCGAG)를 이용하여 각각 클로닝하였고, 상기 방법에 따라, 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 유전자가 삽입된 pCAGGS-S 벡터, 돼지 유행성 설사병 바이러스의 멤브레인 유전자가 삽입된 pCAGGS-M 벡터, 돼지 유행성 설사병 바이러스의 엔벨로프 유전자가 삽입된 pCAGGS-E 벡터, 돼지 유행성 설사병 바이러스의 뉴클레오캡시드 유전자가 삽입된 pCAGGS-N 벡터를 각각 수득하였다.

[0063] 실시예 2: 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자의 제조 및 확인

[0064] 본 실시예에서는 상기 실시예 1의 재조합 발현 벡터를 사용하여 바이러스 유사 입자를 제조하였다. HEK293(5X10E6) 세포(ATCC)에 pCAGGS-S, pCAGGS-M, pCAGGS-E, pCAGGS-N 클론을 1:1:1:1(total 10 ug)의 중량 비로 도입하였고, 구체적으로, 폴리 에틸렌이민(PEI)을 사용하여 DNA:PEI = 1:3의 비율로 transfection하였다. 24시간 후 세포의 배지를 갈아주고 96시간 동안 세포를 배양하였다. Transfection 48~96시간 동안 상층액을 수득하였다. 한편, 대조군으로는 스파이크 및 뉴클레오캡시드 단백질만을 발현시킨 군(PEDV S+ PEDV N)을 사용하였다.

[0065] 이후, 세포 및 세포 찌꺼기를 제거하기 위해 1000 xg, 4℃, 10 min로 원심분리하여 다시 상층액을 분리해내고, 상기 상층액을 다시 100,000xg, 4℃, 1h 조건으로 20% sucrose cushion을 포함하여 원심 분리함으로써, 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자만을 순수 분리하였다. 이후, 펠렛을 1Xsample buffer에 희석한 뒤 웨스턴 블랏(western blot)을 이용하여 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자 내 구조 단백질을 확인하였다.

[0067] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 일 실시예에 따른 공정에 따라 수득한 상층액(도 2의 Supernatants)에서, 면역원성과 밀접한 관련성을 나타내는 스파이크 단백질과 뉴클레오캡시드 단백질의 밴드를 확인하였다. 또한, 상기 스파이크 단백질과 뉴클레오캡시드 단백질의 발현 수준은 대조군에 비해 현저하였는바, 이에 따른 면역 유도 반응 역시 우수할 것으로 예상되었다.

[0069] 실시예 3: 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자의 면역원성 평가

[0070] 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자의 면역원성을 평가하기 위하여 Balb/c 마우스에 실시예 2의 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자 또는 상기 유사 입자에 애주번트로서 Alum을 첨가하여, 이를 2주 간격으로 2회 근육접종 하였다(투여용량 : 100 ul per mice). 2차 접종 2주 후, 혈청을 채취하여 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자를 이용한 ELISA와 중화능시험을 수행하여 혈중 항체가 및 중화 항체가를 검사하였다. 한편, 대조군으로 PBS 또는 상기 PBS에 Alum을 첨가한 군을 사용하였다.

[0072] 그 결과, 도 3 및 도 4에 나타난 바와 같이, 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자를 접종한 모든 군은 ELISA 흡광도(O.D)값이 약 3 부근에서 측정되어 높은 농도로 존재함으로 확인하였으며, 이들의 중화 항체가 역시 높게 검출되었다.

[0073] 즉, 이러한 실험 결과는 일 실시예에 따른 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자는 돼지 유행성 설사병 바이러스 예방용 백신 조성물의 유효성분으로 활용될 수 있음을 나타내는 것이다.

[0075] 실시예 4: 특정 구조 단백질이 조합된 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자 제조 및 확인

[0076] 본 실시예에서는 상기 실시예 1의 제조합 발현 벡터를 사용하여 단일 또는 조합된 구조 단백질을 포함하는 바이러스 유사입자를 제조하였다. 본 실시예에서의 조합된 구조 단백질을 포함하는 실험군 등은 하기 표 1에 나타난 바와 같다.

표 1

Name	Structure Protein
1	PEDV S
2	PEDV S + PEDV M
3	PEDV S + PEDV M + PEDV N
4	PEDV S + PEDV M + PEDV E
5	PEDV S + PEDV N
6	PEDV S + PEDV M + PEDV N + PEDV E

[0079] 구체적으로, pCAGGS-S, pCAGGS-M, pCAGGS-E, pCAGGS-N 클론을 각각 또는 상기 언급된 조합에 따라 HEK293 세포에 폴리 에틸렌이민(PEI)을 사용하여 transfection하였다. 이로부터 48시간 후, 웨스턴 블랏을 이용하여, 세포 용해물 및 상층액 내 존재하는, 구조 단백질 또는 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자 내 구조 단백질을 확인하였다. 또한, 상기의 결과에 기초하여, transfection된 세포 내 S 단백질과 M 단백질 간 발현 비율을 확인하였다.

[0081] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 200kDa(S), 15kDa(E), 24kDa(M), 55kDa(N)의 단백질의 밴드를 통해, 네 종류 구조 단백질의 발현을 확인할 수 있었으며, 구체적으로, M 단백질은 다른 구조 단백질의 발현과는 독립적으로 배지(상층액) 상에 쉽게 방출되는 특성을 보여주었던 반면, S, E, 및 N 단백질은 배지 상층액에서 상대적으로 적게 검출되었다.

[0082] 또한, 도 6 및 도 7에 나타난 바와 같이, S 단독 또는 S 및 N 단백질로 형질감염된 세포에서는 상층액에서 S 구조 단백질이 검출되지 않았던 반면(1, 및 5 참조), M 단백질이 도입된 경우, 상층액에서 공동 형질감염된 S 단백질이 모두 발현되었다(2, 3, 4, 및 6 참조). 한편, E 단백질의 발현은 상층액에서 S 단백질의 발현량을 감소시킨 반면(4, 및 6 참조), N 단백질의 발현은 상층액에서 S 단백질의 수준을 증가시킴을 확인하였다(3 참조). 이러한 발현 변화에 따라, S 단백질의 비율은 S, M, 및 N 단백질로 이루어진 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자(3)에서 가장 높게 관찰되었다.

[0083] 즉, 이러한 실험 결과는 일 실시예에 따른 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사입자 내 구조 단백질의 특정 조합을 통해, 단백질의 발현 양상을 조절할 수 있고, 이를 통하여, 바이러스 유사입자의 면역원성을 강화시킬 수 있음을 보여주는 것이다.

[0085] 실시예 5: 특정 구조 단백질이 조합된 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자의 면역원성 평가

[0086] 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자의 면역원성을 평가하기 위하여 Balb/c 마우스에 S, M, 및 N 단백질로 이루어진 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자(PEDV VLP(SMN))를 2주 간격으로 2회 근육접종 하였다(투여용량 : 100 ul per mice). 2차 접종 2주 후, 혈청을 채취하여 IgA 역가를 측정하였으며, 돼지 유행성 설사병 바이

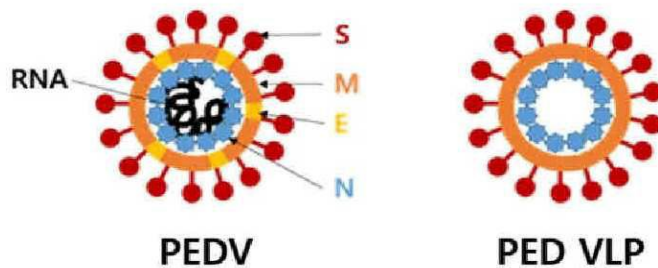
러스 유사 입자를 이용한 ELISA와 중화능시험을 수행하여 혈중 항체가 및 중화 항체를 검사하였다. 한편, 대조군으로 PBS를 첨가한 군을 사용하였으며, 비교군으로 S, 및 M 단백질로 이루어진 돼지 유행성 설사병 바이러스 유사 입자(PEDV VLP(SM))를 첨가한 군, 및 불활화 PEDV를 첨가한 군을 사용하였다.

[0088] 그 결과, 도 8 및 도 9에 나타낸 바와 같이, 일 실시예에 따른 PEDV VLP (SMN)를 첨가한 군은 PEDV VLP(SM) 또는 불활화 PEDV 첨가한 군에 비해 높은 수준의 IgA가 확인되었으며, 우수한 중화 항체를 보여주었다.

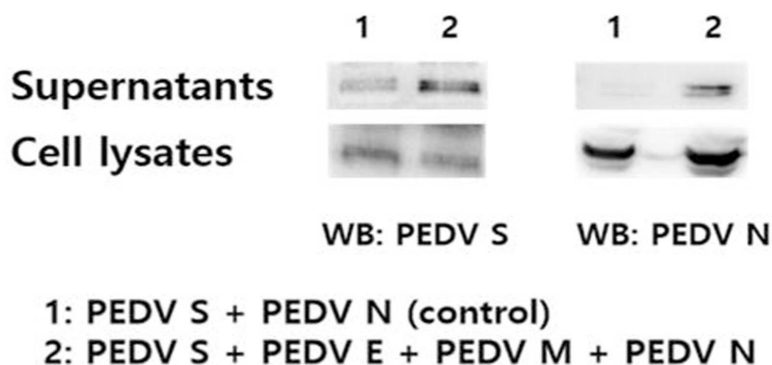
[0090] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

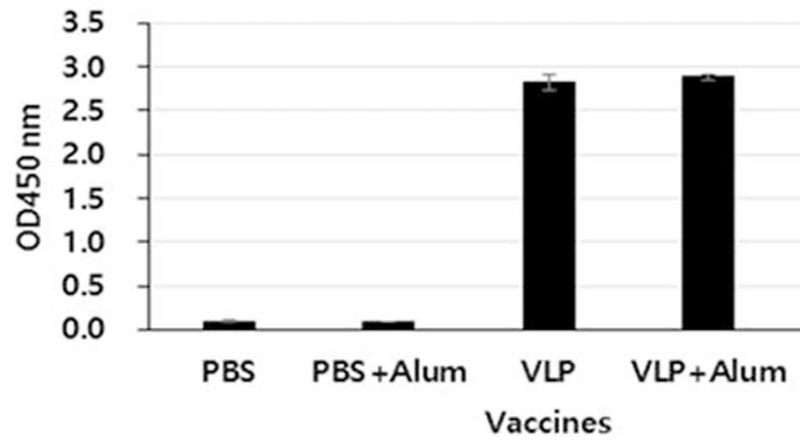
도면1



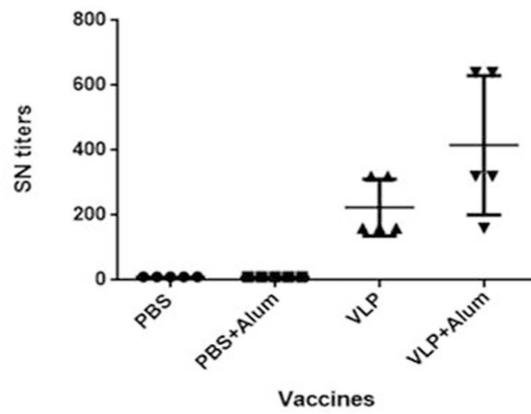
도면2



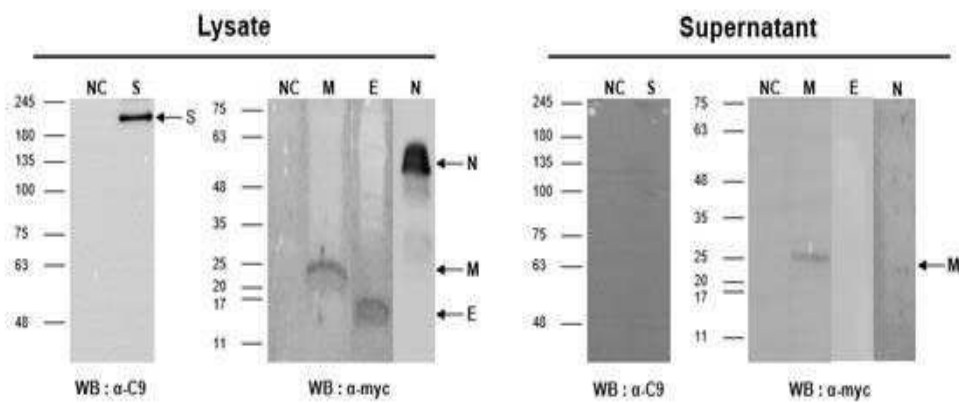
도면3



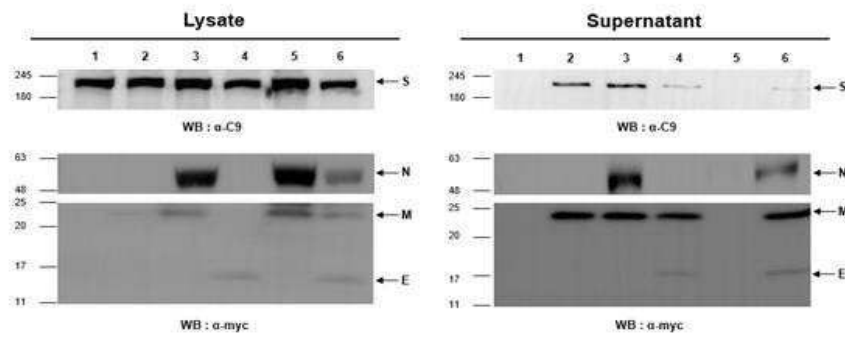
도면4



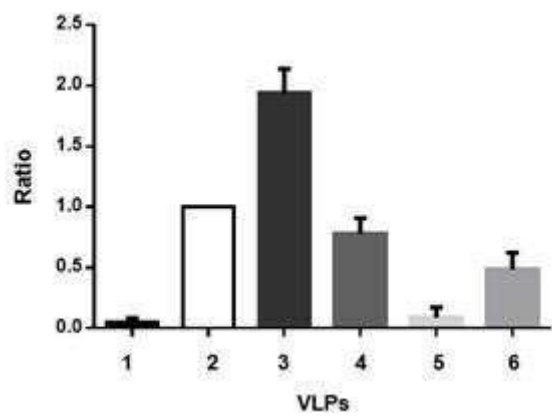
도면5



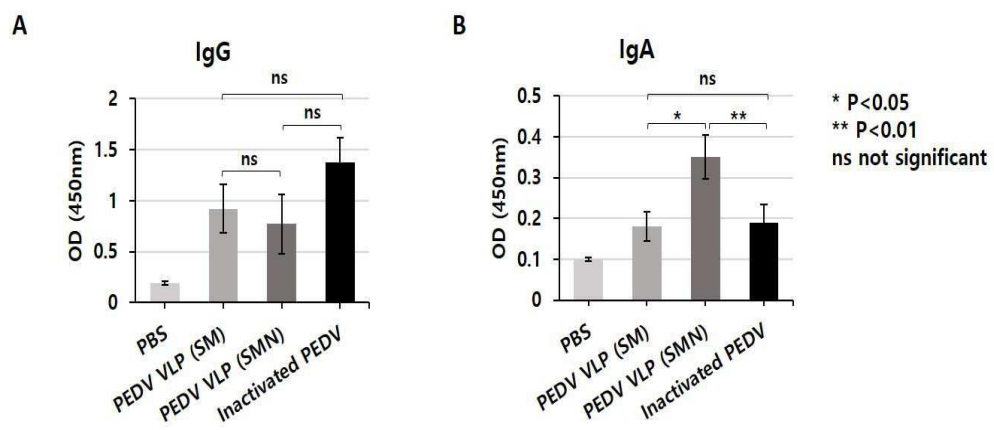
도면6



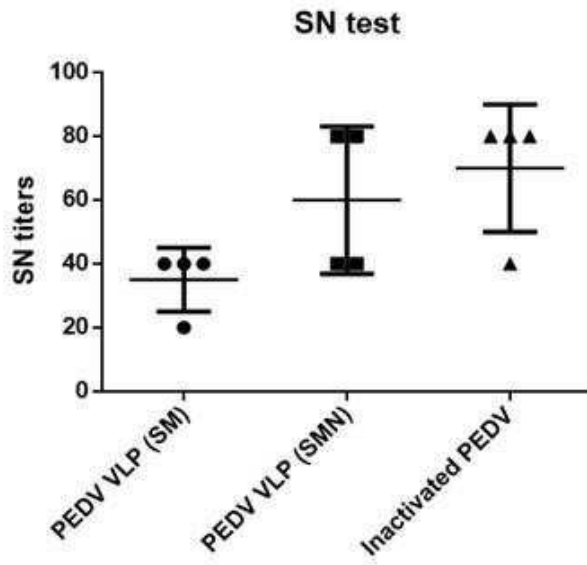
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Chungnam National University
- <120> Porcine epidemic diarrhea virus vaccine using virus-like particles and the method for producing the same
- <130> PN138070KR
- <150> KR 1020200024557
- <151> 2020-02-27
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 4200
- <212> DNA
- <213> PEDV S
- <400> 1

```

ggatccgcc aatgacacc tctgactac ttttgctgt ttctgccgt gctgctgact      60
ctgagcctgc cccaggacgt gaccgctgc cagtctacaa tcaatttcg gagattcttt      120
agcaagttaa acgtgcaggc acctgccgtg gtggtgctgg gaggtacct gccatccatg      180

aacagctcct ctigtattg cggcacaggc atcgagacag actctggcgt gcacggcatc      240
ttcctgtcct acatcgattc tggccagggc ttcgagatcg gcacttccca ggagcctttt      300
gacccatctg gctaccagct gtatctgcac aaggccacaa acggcaatac cagcgccatc      360
gcccggctga gaatctgcca gtttcagac aataagacac tgggccccac cgtgaacgat      420
    
```

gtgaccacag gcaggaactg tctgtccaat aaggccatcc ccgccctcca ggatggcaag	480
aatatcgtgg tgggcatcac atgggacaac gatcgctga ccgtgttcgc cgacaagatc	540
taccactttt atatcaagaa cgattggagc cgggtggcca ccagatgcta caacaagcgg	600
tcctgtgcca tgcagtacgt gtataccccc acatactata tgctgaatgt gaccagcgc	660
ggcgaggacg gcatctacta tgagccttgc acagccaact gttccggcta tgccgccaac	720
gtgttcgcca ccgactccaa cggccacatc cccgagggt tctcttttaa caattggttt	780
ctgctgagca acgattccac cctgtgtcac ggcaaggtgg tgtccaacca gcccctgctg	840
gtgaattgcc tgtgggccat ccctaagatc tacggcctgg gccagtcttt ttctttcaat	900
cagacaatgg acggcgtgtg caacggagct gccgccaga gggcacctga gcccctgaga	960
ttcaacatca atgatacctt tgtgatcctg gccgagggca gcatcgtgct gcacacagcc	1020
ctgggcacca atctgagctt cgtgtgtctcc aacagctccg acccacacaa ggccatcttt	1080
accatccctc tgggcgtgac agaggtgcca tactattgtt tccgaaggt ggatacatac	1140
aagtccaccg tgtataagtt tctggccgtg ctgcccccta cagtgaagga gatcgtgac	1200
accaagtacg gcgagctgta tgtgaatggc ttgggctacc tgcacctggg cctgctggat	1260
gccgtgacaa tcaactttac cggccacggc acagacgatg acgtgagcgg cttctggacc	1320
gtggcctcca caaattttgt ggacgcactg atcgaggtgc agggcacccg catccagaga	1380
atcctgtact gcgatgaccc agtgagccag ctgaagtgtt ctcaggtgag cttcgacctg	1440
gatgacggct tttatcccat ctctagcaga aacctgtgt ctcacgagca gcccacgac	1500
ttcgtgacac tgccttcttt caacgatcac agctttgtga atatcacctg gtctgccgcc	1560
tttggcggac acagcggagc aaatctgac gcctccgaca ccacaatcaa cggttctcc	1620
tctttttgcg tggataccag acagttcacc atcacactgt tttacaacgt gacaaatagc	1680
tacggtacg tgagcaagag ccaggactcc aattgtccct tcaccctcca gtctgtgaac	1740
gattatctgt ccttctctaa gttttgcgtg agcacatccc tgctggccgg agcatgtacc	1800
atcgacctgt tcggctaccc tgagtttggc tccggcgtga agttcacatc tctgtatttc	1860
cagtttacca agggcgagct gatcacccgc acaccaaagc cctccaggg cgtgaccgac	1920
gtgagcttca tgacctgga cgtgtgcaca aagtacacca tctatggctt caaggcgag	1980
ggcatcatca cctgacaaa tagctccttt ctggccggcg tgtactatac ctctgatagc	2040
ggccagctgc tggccttcaa gaacgtgaca tccggcggcg tgtactctgt gacccttgt	2100
tccttttctg agcaggccgc ctatgtggat gacgacatcg tgggcgtgat ctctagcctg	2160
agcaattcca ccttcaaaa tacacgggag ctgcctggct tcttttacca ctctaacgac	2220

ggcagcaatt gcaccgagcc agtgctgggtg tacagcaaca tcggcgtgtg caagtctggc	2280
agcatcggct atgtgccact ccaggatggc caggtgaaga tcgccccaat ggtgacaggc	2340
aacatctcca tccccacaa tttctccatg tctatcagaa cagagtacct ccagctgtat	2400
aacacccccg tgctctgtga ctgcgtgacc tacgtgtgca acggcaatag ccggtgcaag	2460
cagctgtga cacagtatac cgccgcctgt aagaccatcg agagcgccct ccagctgtcc	2520
gccagactgg agtctgtgga agtgaatagc atgtgacca tctccgagga ggccctccag	2580
ctggccacaa tctctcttt caacggcgac ggctacaact ttaccaatgt gctgggcgtg	2640
agcgtgtatg atccagcctc cggcaggggtg gtgcagaagg gcagcttcat cgaggacctg	2700
ctgtttaaca aggtgggtgac caatggcctg ggcacagtgg acgaggatta caagaggtgc	2760
tccaacggcc gctctgtggc agacctgggtg tgcgccagt actatagcgg cgtgatgggtg	2820
ctgcctggcg tgggtgatgc cgagaagctg cacatgtaca ggcctccct gatcggcggc	2880
atggcactgg gaggcctgac caccgccgc gccctgcat tctccacgc cgtgcaggcc	2940
aggctgaatt acctggccct ccagacagac gtgtccagc gcaaccagca gctgctggcc	3000
gagtccttca actctgccat cggcaatata accagcgct ttgagtccgt gaaggaggcc	3060
atcagccaga cctccaacgg cctgaataca gtggcccacg ccctgacaa ggtgcaggag	3120
gtggtgaaca gccagggcag cgccctgaca cagctgacca tccagctcca gcacaacttc	3180
caggccatca gctcctctat cgacgacatc tacagccggc tggacatcct gagcgccgac	3240
gtgcaggtgg atcggtgat cacaggcaga ctgtctgccc tgaatgcctt tgtggcccag	3300
acctgacaa agtacaccga ggtgcaggcc agccggaagc tggcccagca gaaggtgaac	3360
gagtgctga agtctcagag ccagagatat ggcttctgtg gcggcgacgg cgagcacatc	3420
tttagcctgg tgcaggcagc accacagggc ctgctgttcc tgcacaccgt gctgggtccc	3480
ggcgattttg tgaatgtgat cgccatcgac ggctgtgctg tgaacggcga catcgccctg	3540
acctgaggg agccccgcct ggtgctgttc acacacgagc tccagacctc cacagccacc	3600
gagtatctgg tagctccag gcgcatgttc gagccccgca agcctaccgt gtctgacttt	3660
gtgcagatcg agagctgcgt ggtgacctac gtgaacctga catccgacca gctgcctgat	3720
gtgatcccag actatatcga tgtgaataag acctggatg agatcctggc cagcctgcca	3780
aacaggatcg gaccatccct gccctggac gtgttcaacg ccacctacct gaatctgaca	3840
ggcgagatcg ccgatctgga gcagaggctc gagtctctgc gcaataccac agaggagctg	3900
aggagcctga tctacaacat caacaatacc ctggtggacc tggagtggct gaaccgcgtg	3960

gagacatata tcaagtggcc ttgggtgggtg tggctgatca tcttcatcgt gctgatcttt 4020
 gtggtgtctc tgctggtgtt ctgctgtatc agcaccggct gctgtggatg ttgtggctgc 4080
 tgtggcgctt gcttttccgg atgctgtagg ggaccaagge tccagcctta cgaggcattt 4140
 gagaaggctc acgtccaggg aggaactgaa accagccagg tcgcacccgc ataagaattc 4200
 4200

<210> 2
 <211> 735
 <212> DNA
 <213> PEDV M
 <400> 2

gaattcgcca ccatgtctaa cggcagcatc cctgtggacg aagtgatcca gcacctgcgg 60

aactggaact tcacctggaa tatcatcctg accatcctgc tgggtggtgt gcagtacggc 120
 cactacaagt attccgcctt cctgtatggc gtgaagatgg ccatcctgtg gattctgtgg 180
 ccaactggtg tggccctgag cctgttcgat gccctggcct cctttcaggt gaactgggtg 240
 ttctttgcct tctctatcct gatggcctgc atcacctga tgctgtggat catgtacttt 300
 gigaacagca tccggctgtg gcggagaaca cactcctggt ggtctttcaa tcccagagac 360
 gacgccctgc tgaccacaag cgtgatgggc agacaggtgt gcatccccgt gctgggcgat 420
 cctacaggcg tgacactgac cctgtctgagc ggccacctgc tgggtggaggg ctacaagggtg 480

gcaacaggag tgcaggtgtc ccagctgcca aactttgtga ccgtgaggaa ggccaccaca 540
 accatcgtgt atggcagggt gggccgctct gtgaatgcca gctccggcac aggctgggcc 600
 ttctactgtc gcagcaagca cggcgactat agcgccgtgt ccaatccctc tgccgtgctg 660
 accgattccg agaaggtgct gcacctggtg ggaggagagc agaagctgat ctctgaggag 720
 gacctgtaac tcgag 735

<210> 3
 <211> 285
 <212> DNA
 <213> PEDV E
 <400> 3

gaattcgcca ccatgctgca gctggtgaac gacaatggcc tgggtggtgaa cgtgatcctg 60

tggctgctgg tgctgttctt tetgtgtatc atctctatca ccttcgtgca gctggtgaac 120
 ctgtgcttta catgtcacag gctgtgcaat agcgccgtgt ataccccat cggccggctg 180
 tacagagtgt ataagagcta catgcggatc gacccctgc cttccacagt gatcgatgtg 240

ggcggcgagc agaagctgat cagcgaggag gatctgtaac tcgag	285
<210> 4	
<211> 1104	
<212> DNA	
<213> PEDV N	
<400> 4	
gaattcgcca ccattggcttc cgtgtctttc caggatagag gcagaaaacg agtcccactg	60
tcactgtatg ctccactgag agtcactaat gataaacccc tgtctaaggt gctggccaat	120
aacgccgtgc ctaccaacaa gggcaacaac acccctccag cctctagggc caacagcagg	180
tctcggagca ggggcaatgg caacaatcgg agcaggtctc caagcaataa caggggcaat	240
aaccagtcca gaggcaactc tcagaatagg ggcaacaatc agggcagggg cgcctctcag	300
aatcggggcg gcaataacaa caataacaac aagtccagga accagagcaa caatcggaac	360
cagtccaatg ataggggcgg cgtgacctct agggacgacg tggtggccgc cgtgaaggat	420
gccctgaagt ctctgggcat cggcgagaat ccgcatcggc acaagcagca gcagaagcca	480
aagcaggaga agtctgacaa cagcggcaag aatacccca agaagaacaa gagcagggcc	540
acctctaagg agcgggatct gaaggacatc ccagagtgga ggcggatctc taagggcgag	600
aactccgtgg ccgcctgctt tggccacgc ggcggcttca agaacttcgg cgatgccgag	660
ttcgtggaga agggcgtgga cgcctctggc tatgccaga tcgcctctct ggccccaac	720
gtggccgcc tgcgttttgg cggcaatgtg gccgtgcggg agctggccga ttcttacgag	780
atcacctaca actataagat gaccgtgcca aagtctgac ccaacgtgga gctgctggtg	840
tctcaggtgg atgccttcaa gacaggcaac gccaaagtgc agcgaagaa ggagaagaag	900
aataagaggg agaccacact gcagcagcac gaggaggcca tctacgatga cgtgggcgcc	960
ccttctgatg tgaccacgc caatctggag tgggataccg ccgtggacgg cggcgacacc	1020
gccgtggaga tcatcaatga gatctttgat actggcaatg gaggcgaaca gaaactgatt	1080
agtgaggaag acctgtaact cgag	1104